

## EFECTO SIMBIÓTICO DEL EXTRACTO DE *Smallanthus sonchifolius* (YACÓN) Y *Lactobacillus plantarum* FRENTE A *Escherichia coli*

### Symbiotic relationship from yacon extract (*Smallanthus sonchifolius*) and *Lactobacillus plantarum* against *Escherichia coli*

Carlos A. Vegas, Boris O. Pichihua, Carmen Peña, Amparo I. Zavaleta

Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos

#### RESUMEN

El desarrollo de estrategias que permitan un mayor control de la microbiota intestinal ha incrementado el interés por asociar prebióticos y probióticos, en una relación simbiótica, con el propósito de reducir la presencia de microorganismos patógenos. El objetivo de este estudio fue analizar el efecto simbiótico del extracto de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y *Lactobacillus plantarum* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* enteropatógena. Para ello, previamente se analizó la concentración óptima del extracto de yacón para el crecimiento de *L. plantarum* y su efecto prebiótico. La cinética de crecimiento de ambos microorganismos fue determinada por densidad óptica, conteo por microscopio y células viables en placas. *Lactobacillus plantarum* presentó un óptimo crecimiento a 15°Brix, alcanzando 10<sup>9</sup> células/mL; por el contrario, *E. coli* se mantuvo a bajos niveles poblacionales. La combinación de extracto de yacón y *L. plantarum* inhibió el crecimiento de *E. coli* enteropatógena a las 16 h de incubación.

**Palabras clave:** Prebiótico, probiótico, *Smallanthus sonchifolius*, *Lactobacillus plantarum*, *Escherichia coli*.

#### SUMMARY

The development of strategies for a better control of gut microbiota have increased the interest in associate prebiotics and probiotics, in a symbiotic state, in order to reduce the presence of pathogenic microorganisms. The aim of this work was to study the symbiotic effect between *Smallanthus sonchifolius* (yacon) extract and *Lactobacillus plantarum* against the growth of enteropathogenic *Escherichia coli*. To do this, the best concentration of yacon extract for the growth of *L. plantarum* and their prebiotic effect were previously done. The microbial growth kinetic was determined by optical density, counting by microscope and viability in plate. *L. plantarum* presented an optimal growth at 15°Brix, reaching 10<sup>9</sup> cells/mL; whereas *E. coli* remained at low population levels. The combination of yacon extract and *L. plantarum* totally inhibited the growth of enteropathogenic *E. coli* at 16 h of incubation.

**Keywords:** Prebiotic, probiotic, *Smallanthus sonchifolius*, *Lactobacillus plantarum*, *Escherichia coli*.

#### INTRODUCCIÓN

En los últimos años, a nivel mundial se ha incrementado la búsqueda de estrategias que permitan manipular la microbiota presente en el intestino grueso humano, con el propósito de favorecer el crecimiento de microorganismos con efectos beneficiosos para la salud, reduciendo el riesgo a contraer enfermedades por la presencia de microorganismos patógenos<sup>(1)</sup>. En consecuencia, se ha propuesto el consumo de prebióticos, probióticos y su combinación (simbióticos).

El prebiótico es un ingrediente alimenticio no digerible que estimula selectivamente el crecimiento y actividad de un grupo limitado de bacterias en el colón<sup>(2)</sup>. Los ingredientes, utilizados como prebióticos son los galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS)<sup>(3)</sup>. El yacón (*Smallanthus sonchifolius*), es

una raíz andina especialmente conocida por su alto contenido de FOS<sup>(4)</sup>, por lo que ha sido recomendado como alimento funcional e ingrediente de suplementos dietéticos con potencial prebiótico.

El probiótico se define como un ingrediente microbiano vivo, que al ser ingerido en cantidades suficientes, influye positivamente en la salud de quien lo consume<sup>(5)</sup>. Las bacterias probióticas comunes, que están mayoritariamente en el tracto intestinal, pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*<sup>(6)</sup>. Estas bacterias producen compuestos como ácidos orgánicos y bacteriocinas que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos<sup>(7)</sup>.

En los últimos años, la mezcla de prebióticos y probióticos en una relación simbiótica, ha sido propuesta como una alternativa para aumentar la supervivencia de los probióticos en el tracto intestinal. En este estado,

se produce un efecto sinérgico ya que los prebióticos constituyen el sustrato principal de las bacterias probióticas, estimulan el crecimiento de cepas específicas, y por tanto, contribuyen a la selección y colonización de la microbiota responsable de favorecer la salud <sup>(2,8)</sup>.

El efecto prebiótico del yacón ha sido demostrado en bacterias lácticas pertenecientes al género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* <sup>(9)</sup>. Sin embargo, el efecto simbiótico del yacón con las bacterias lácticas, aún no ha sido estudiado. En consecuencia, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto simbiótico del extracto de yacón y *Lactobacillus plantarum* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* enteropatógena. Para ello, previamente se optimizaron las concentraciones de extracto de yacón para el buen crecimiento de *L. plantarum* y se analizó el efecto prebiótico del extracto en ambos microorganismos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Elaboración del extracto de yacón

Las raíces de yacón utilizadas para este estudio proceden del distrito de Palca, provincia de Tarma (Junín), ubicado a 3050 m de altitud. El procedimiento utilizado para la obtención del extracto ha sido descrito por Manrique *et al.* <sup>(10)</sup>, diferenciándose únicamente en que la concentración del jugo prebiótico se realizó a 90°C con agitación hasta obtener 40°Brix. Finalmente, antes de llevar a cabo el estudio microbiológico, el extracto fue centrifugado a 5000 rpm, por 20 minutos, y el sobrenadante autoclavado a 115°C por 15 minutos.

### Microorganismos, medios de cultivo y condiciones de incubación

Los microorganismos utilizados fueron *Lactobacillus plantarum* CECT 748 y *Escherichia coli* enteropatógena.

*L. plantarum* fue reactivado en el caldo de cultivo De Mann, Rogosa y Sharpe (MRS; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y *E. coli* en caldo de cultivo Triptona de soya (TSB; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra). Los medios de cultivo sólidos empleados para *L. plantarum* y *E. coli* fueron agar MRS suplementado con 2% (p/v) de agar y agar MacConkey (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), respectivamente. Los cultivos bacterianos fueron incubados a 37°C por 24 h en condiciones de aerobiosis.

### Estudio de los efectos prebiótico y simbiótico

Los efectos prebiótico y simbiótico fueron evaluados mediante el análisis de las cinéticas de

crecimiento de *L. plantarum* y *E. coli* cultivados en matraces Erlenmeyer de 250 mL, por triplicado. Todos los cultivos se realizaron a un volumen final de 25 mL, de forma estática, fueron incubados a 37°C y en condiciones de aerobiosis. Los puntos de muestreo fueron a 0, 4, 16, 24, 48 y 72 h. El seguimiento de los cultivos fue realizado mediante la medición de la densidad óptica por espectrofotometría a 600 nm (Génesis 10 uv, Thermo Electron Corporation. USA), el conteo de la población de microorganismos por microscopía mediante cámara de Neubauer mejorada (0,0025 mm<sup>2</sup> y 0,100 mm de profundidad) y el recuento de viables en agares MRS y MacConkey para *L. plantarum* y *E. coli*, respectivamente. Asimismo, se realizaron análisis físico-químicos al inicio y final del periodo de incubación, tales como: determinación de la acidez total titulable <sup>(11)</sup>, pH mediante potenciómetro 213 (Hanna Instruments SL, España) y sólidos solubles totales (°Brix) mediante refractómetro manual RHB-32 ATC (Lumen Optical Instrument Co., Ltd., China).

Previamente, se determinó el crecimiento óptimo de *L. plantarum*, para lo cual, se inóculo a diferentes concentraciones de extracto de yacón: 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 °Brix, suplementado con los componentes del caldo MRS sin glucosa. La población inicial de *L. plantarum* fue de  $1 \times 10^6$  cél/mL. El seguimiento de los cultivos se realizó por densidad óptica.

### Efecto prebiótico

La población inicial de ambos microorganismos fue de  $1 \times 10^6$  cél/mL. Los resultados microbiológicos se compararon con los obtenidos en caldos MRS para *L. plantarum* y TSB para *E. coli*.

### Efecto simbiótico

Para el análisis, los microorganismos fueron inoculados conjuntamente a la concentración de  $1 \times 10^7$  cél/mL.

## RESULTADOS

### Determinación de la concentración del extracto de yacón para el crecimiento de *L. plantarum*

Para conseguir un buen crecimiento de *L. plantarum* se analizaron diferentes concentraciones del extracto de yacón expresadas en °Brix.

En la figura 1, se observa un mayor crecimiento a 5, 10 y 15 °Brix; seleccionándose la última concentración, ya que la velocidad de crecimiento fue ligeramente superior a las otras dos concentraciones.

### Efecto prebiótico del yacón sobre el crecimiento de *L. plantarum*

La cinética de crecimiento de *L. plantarum* obtenida de los cultivos con extracto de yacón a 15 °Brix, fue comparada con la obtenida en caldo MRS (control). El análisis por densidad óptica, mostró que *L. plantarum* creció mejor en medio MRS que en el extracto de yacón. Sin embargo, en el conteo por microscopía óptica se observó lo contrario (figura 2). Resultados similares al microscopio fueron obtenidos en el recuento de viables. Con el extracto de yacón se consiguieron poblaciones mayores a  $10^9$  UFC/mL; mientras que en el medio MRS fue  $10^8$  UFC/mL. La población viable de *L. plantarum* en caldo con extracto de yacón disminuyó a las 24 h, mientras que en caldo MRS a las 48 h. Al finalizar el tiempo de incubación, el análisis físico-químico mostró que *L. plantarum* incrementó la acidez total de 0,45% (p/v) a  $1,85 \pm 0,173\%$  (p/v), disminuyendo el pH de 5,85 a  $3,79 \pm 0,012$  (tabla 1). Asimismo, la concentración de sólidos solubles totales aumentó de 15 a  $15,72 \pm 0,289$  °Brix.

### Efecto prebiótico del yacón sobre el crecimiento de *E. coli*

La cinética de crecimiento de *E. coli* obtenida de los medios con extracto de yacón, fue comparada con la obtenida en caldo TSB (control). En los tres análisis

microbiológicos realizados se observó que el extracto de yacón no es un medio adecuado para el crecimiento de *E. coli* (figura 2). Tanto en la densidad óptica, en el conteo por microscopía óptica, como en el recuento de viables, se observó que desde la inoculación *E. coli* se mantuvo a bajos niveles poblacionales. Asimismo, en el recuento de viables se observó que la población de *E. coli* disminuyó a partir de las 16 h. El análisis físico-químico realizado al inicio y final del periodo de incubación no mostró una variación significativa (tabla 1).

### Efecto simbiótico del yacón con *L. plantarum* sobre el crecimiento de *E. coli*

Previo al análisis del efecto simbiótico, se realizaron pruebas de cultivabilidad de *L. plantarum* y *E. coli* en placas conteniendo medio MRS y MacConkey, y viceversa, comprobándose que los medios son específicos; por lo tanto, las colonias recuperadas de ellos correspondieron a *L. plantarum* y *E. coli*, respectivamente.

En relación al efecto simbiótico, tanto la recuperación de colonias de *L. plantarum* en medio MRS, como la población total observada al microscopio fueron  $10^9$  cél/mL (figura 3). Sin embargo, la población de *L. plantarum* en medio MRS disminuyó a partir de las 24 h; mientras que *E. coli* a partir de las 16 h.

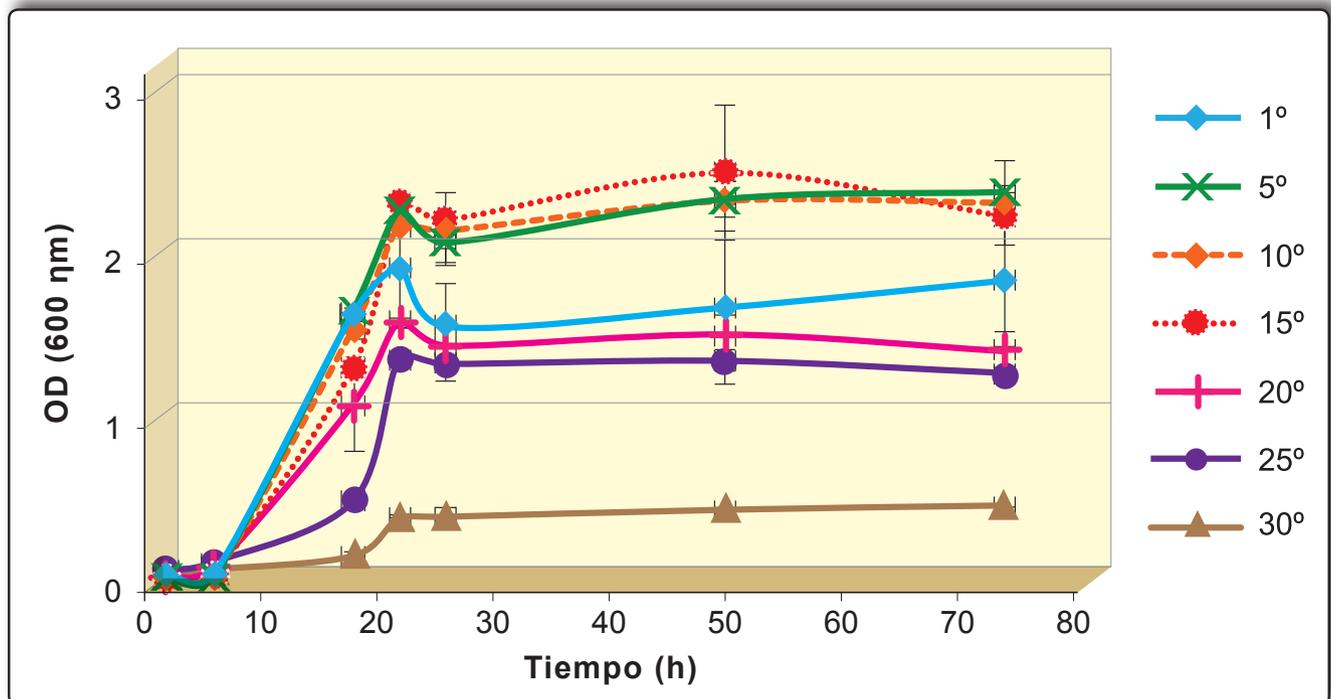


Figura 1. Cinética de crecimiento de *L. plantarum* a diferentes concentraciones de extracto de yacón en °Brix.

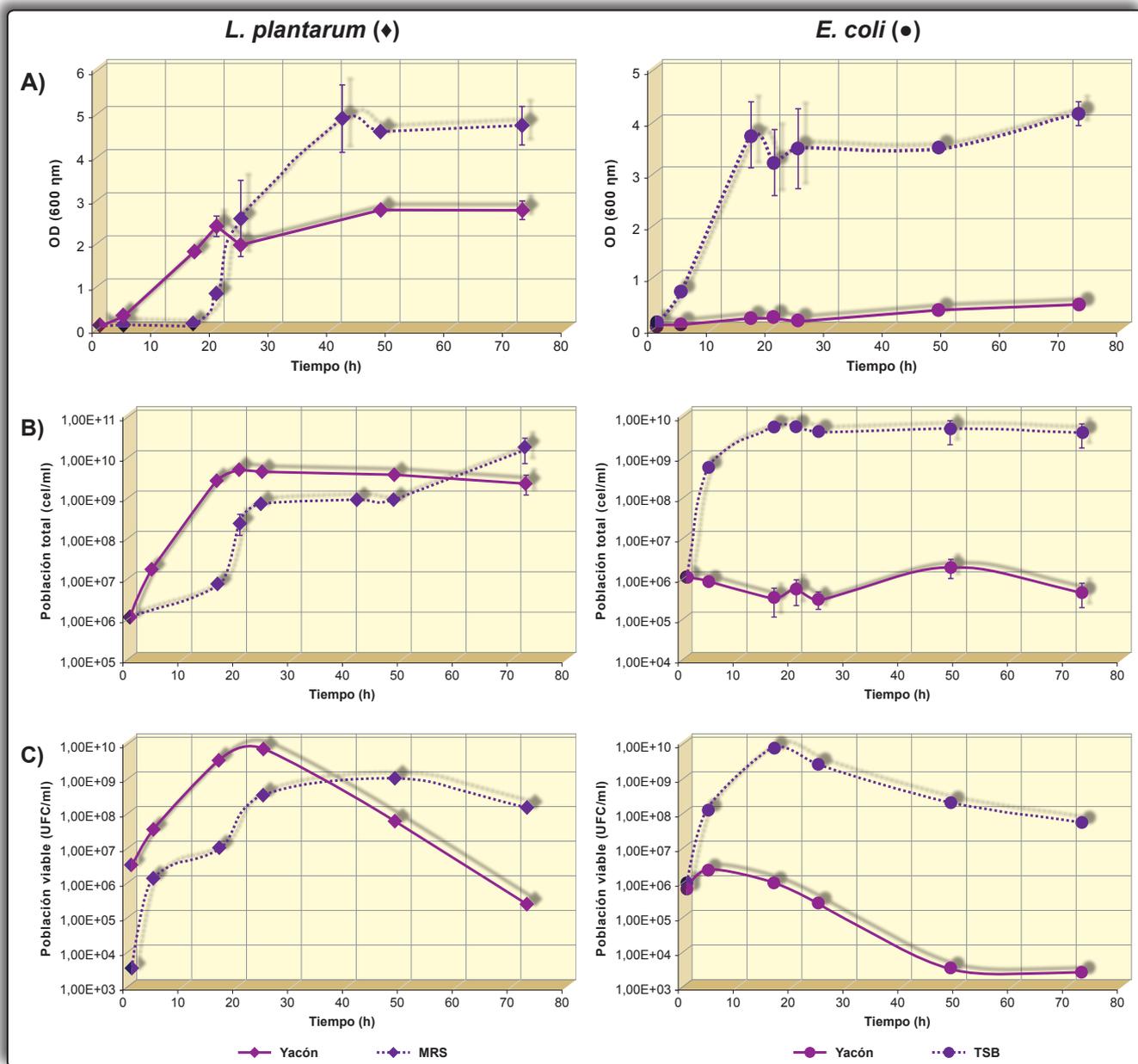


Figura 2. Cinética de crecimiento de *L. plantarum* y *E. coli* en medios conteniendo extracto de yacón, MRS y TSB. A) Densidad óptica a 600 nm. B) Conteo al microscopio de la población total. C) Recuento de viables en placa.

Al finalizar el periodo de incubación, la acidez total se incrementó de 0,45% (p/v) a  $1,8 \pm 0,173\%$  (p/v); el pH disminuyó de 5,85 a  $3,85 \pm 0,017$  y la concentración de sólidos solubles se mantuvo en  $15 \pm 0,2$  °Brix (tabla 1).

### DISCUSIÓN

Se evaluó el efecto simbiótico de la combinación de *L. plantarum* y extracto de yacón sobre el crecimiento de *E. coli* enteropatógena, para lo cual, previamente

se determinó la adecuada concentración del extracto de yacón para el óptimo crecimiento de *L. plantarum*, ya que una baja o alta concentración podría afectar su crecimiento y, en consecuencia, reducir o inactivar los efectos beneficiosos en la salud. Así, en extracto de yacón a la concentración de 15°Brix se obtuvo mayor población de *L. plantarum* que en medio MRS; este incremento se explica por la capacidad de fermentar FOS<sup>(9)</sup>. Por el contrario, el extracto de yacón mostró ser un medio inadecuado para el cultivo de *E. coli*, ya que la población inoculada se mantuvo hasta las

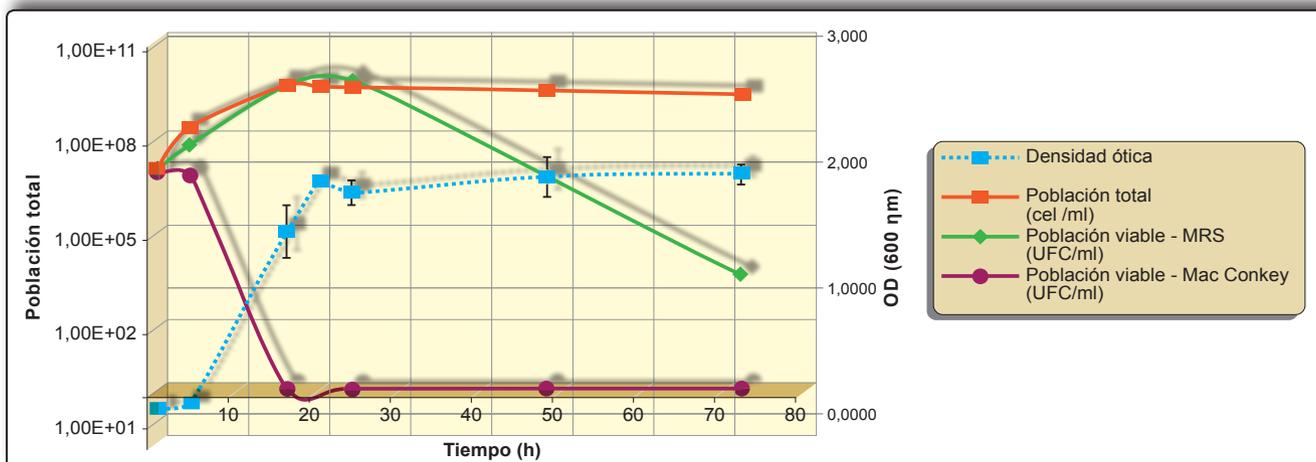


Figura 3. Efecto simbiótico del extracto de yacón y *L. plantarum* sobre el crecimiento de *E. coli*.

16 h, posiblemente debido a los azúcares residuales presentes en el extracto, al agotarse estos compuestos, la población de *E. coli* disminuyó drásticamente.

Los mecanismos de cómo los oligosacáridos prebióticos son selectivamente metabolizados por miembros beneficiosos de la microbiota intestinal, no están adecuadamente entendidos (12). Sin embargo los estudios continúan; así por ejemplo, se ha descrito que la celobiosa estimula el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* y *Streptococcus thermophilus* y mantiene bajas poblaciones de *E. coli* y *Staphylococcus aureus* (1).

Una vez analizado el efecto prebiótico del extracto de yacón en *L. plantarum* y *E. coli*, se procedió a analizar el efecto simbiótico del extracto y *L. plantarum* sobre el crecimiento de *E. coli*. Los resultados mostraron que la población obtenida por el conteo al microscopio a las 16 h correspondería a *L. plantarum*, basándonos en la población viable obtenida en medio MRS y en la ausencia de colonias de *E. coli* en medio MacConkey. La inhibición del crecimiento de *E. coli* por la combinación del extracto de yacón y *L. plantarum*, coincide con otros estudios realizados, donde especies del género *Lactobacillus* inhiben el crecimiento de cepas de *E. coli* gastrointestinales (13, 14). El incremento de la acidez

por *L. plantarum*, y en consecuencia, la disminución del pH del medio pueden estar relacionadas con esta inhibición. Se ha descrito que la producción de ácidos orgánicos por las bacterias lácticas no sólo disminuye el pH, sino también afectan el crecimiento de patógenos (15, 16). Además, las bacterias ácido lácticas producen bacteriocinas como agentes antimicrobianos (17); así, cepas de *L. plantarum* producen plantaricina con efecto contra *E. coli* (18).

Esta investigación permite demostrar el efecto simbiótico del yacón y *L. plantarum* sobre el crecimiento de *E. coli* enteropatógena. Sin embargo, es necesario ampliar el estudio para determinar el espectro antimicrobiano, la dosis óptima y la forma farmacéutica.

**CONCLUSIONES**

El extracto de yacón, como fuente natural de prebióticos, estimuló el crecimiento de *L. plantarum* y, por el contrario, mantuvo el crecimiento de *E. coli* enteropatógena a bajos niveles poblacionales. La mezcla del extracto de yacón y *L. plantarum* inhibió el crecimiento de *E. coli* enteropatógena.

**Agradecimientos.** Este trabajo fue financiado

Tabla 1. Análisis físico-químico del efecto prebiótico y simbiótico.

Efecto prebiótico y simbiótico	Sólidos solubles totales (°Brix)		Acidez total titulable (% p/v)		pH	
	Tiempo (h)					
	0	72	0	72	0	72
<b>Prebiótico:</b>						
yacón vs <i>L. plantarum</i>		15,72±0,289		1,85±0,173		3,79±0,012
yacón vs <i>E. coli</i>	15	15	0,45	0,45	5,85	5,72±0,006
<b>Simbiótico:</b>						
(yacón + <i>L. plantarum</i> vs <i>E. coli</i> )		15±0,2		1,8±0,173		3,85±0,017

con fondos del Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica, contrato N° 015-2013-CONCYTEC-P y Fondos para la Innovación, Ciencia y Tecnología, Contrato N° 230-FINCYT-IA-2013.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yacine A, Aïcha TM, Belkacem M, Khadidja EK, Bochra M, Souhila K. The *in vitro* effect of a symbiotic combination between cellobiose and two probiotic strains toward two pathogenic bacteria. *J Life Sci* 2012; 6(6): 615-23.
2. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 1995; 125(6): 1401-12.
3. Voragen GJA. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends Food Sci Tech* 1998; 9(8-9): 328-35.
4. Campos D, Betalleluz-Pallardel I, Chirinos R, Aguilar-Galvez A, Noratto G, Pedreschi R. Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chem* 2012; 135(3): 1592-9.
5. Ashwell M. Conceptos sobre alimentos funcionales. ILSI Europe Concise Monograph Series, ILSI Press. 2005.
6. ONU/FAO. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO Alimentación y nutrición 85. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, 2006
7. Pundir RK, Rana S, Kashyap N, Kaur A. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples: an *in vitro* study. *J Appl Pharm Sci* 2013; 3(3): 85-93.
8. Roberfroid MB. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(suppl.): 1682S-7S.
9. Pedreschi R, Campos D, Noratto G, Chirinos R, Cisneros-Zevallos L. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. *J Agr Food Chem* 2003; 51(18): 5278- 84.
10. Manrique I, Párraga A, Hermann M. Jarabe de yacón. Principios y Procesamiento. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). N° 8A. Centro Internacional de la Papa, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. Fundación Erbacher, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, 2005. p. 31.
11. Ough CS, Amerine MA. Methods for analysis of must and wines. Wiley-Interscience. California, 1987.
12. Perrin S, Warchol J, Grill JP, Schneider F. Fermentation of fructooligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. *J Appl Microbiol* 2001; 90(6): 859-65.
13. Piper EL, Leyva KJ. Growth inhibition of gastrointestinal strains of *Escherichia coli* by *Lactobacillus* species. *J Ariz-Nev Acad Sci* 2009; 41(2): 49-54.
14. Fooks JL, Gibson GR. *In vitro* investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiol Ecol* 2002; 39(1): 67-75.
15. Tambekar DH, Bhutada SA. Studies on antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by *Lactobacillus* strains isolated from milk of domestic animals. *Internet J Microbiol* 2009; 8(2): 1-6.
16. Matamoros S, Pilet MF, Gigout F, Prévost H, Leroi F. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiol* 2009; 26(6): 638-44.
17. Ahmed Z, Wang Y, Cheng Q, Imran M. *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: An overview. *African J Biotech* 2010; 9(20): 2843-50.
18. Jama YH, Varadaraj MC. Antibacterial effect of plantaricin LP84 on foodborne pathogenic bacteria occurring as contaminants during *idli* batter fermentation. *World J Microbiol Biotech* 1999; 15(1): 27-32.

## Correspondencia

Nombre: Carlos Alfredo Vegas Pérez  
 Dirección: Jr. Puno 1002, Lima 1  
 E-mail: azavaletap@unmsm.edu.pe